

ELISA-Kits zum Nachweis von Kollagenase 3 als Proenzym und in aktivierter Form in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen

- 5 Die Erfindung betrifft ELISA-Kits zum Nachweis der von Kollagenase 3 als Proenzym und in aktivierter Form in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen sowie in Zellkulturüberständen, und monoklonale Antikörper, die Kollagenase 3 in latenter und aktivierter Form spezifisch erkennen. Anwendungsgebiete sind die Medizin und hier besonders die Diagnostik, insbesondere
- 10 die Verlaufsdiagnostik von entzündlichen rheumatischen Erkrankungen (rheumatoide Arthritis), systemischem Lupus Erythematosus (sLE) mit Organbeteiligungen und Gewebeproliferation sowie von Tumorerkrankungen (z.B. Mamma- und colorectale Carcinome).
- 15 Die *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-Technik ist gegenwärtiger Technologiestandard in klinischen Labors. Mit dieser Technologie können u.a. Markerproteine für bestimmte Krankheiten in Körperflüssigkeiten von Patienten bestimmt werden.
- 20 Matrix Metalloproteinasen (MMPs) bilden eine Familie aus sezernierten und membrangebundenen Endoproteinasen, die extrazelluläre Matrixproteine hydrolisieren (Nagase, H. and Woessner, F. Jr., J. Biol. Chem. 1999, 274, 21491-21494). Auf der Grundlage ihrer bevorzugten Substrate und struktureller Merkmale kann man MMPs in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und Membran-Typ Metalloproteasen einteilen.
- 25 Kollagenase 3 (MMP-13) wird von Zellen als inaktives Proenzym (Prokollagenase 3, Pro-MMP-13) freigesetzt und extrazellulär durch die Abspaltung eines Propeptids in die aktivierte Form überführt.
- 30 Sowohl Prokollagenase 3 als auch die aktivierte Kollagenase 3 sind typischerweise im ausdifferenzierten, adulten Gewebe nicht nachweisbar. Ihr Vorkommen ist jedoch im Zusammenhang mit einer ganzen Reihe von destruktiven Krankheitsbildern beschrieben: Bei der Ausbildung von Brustcarcinomen (Nielsen BS et al., Cancer Res.

2001 61:7091-7100), Rheumatoider Arthritis (Westhoff CS et al., Arthritis Rheum. 1999 42:1517-1527) und Osteoarthrose (Shlopov BV et al. Arthritis Rheum. 1997 40:2065-2074) ist der Gehalt an Prokollagenase 3-mRNA in den betroffenen Gewebetypen stark hochreguliert. Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass
 5 Kollagenase 3 ein für die medizinische Diagnostik hochinteressantes Markerprotein ist.

Bisher existieren jedoch für keinen Krankheitsverlauf, auch nicht für Rheumatoide Arthritis, Untersuchungen zum tatsächlichen Gehalt von Prokollagenase 3 oder aktivierter Kollagenase 3 in Körperflüssigkeiten wie Serum oder Gelenkflüssigkeit, da
 10 bis dato keine zufriedenstellende technologische Lösung auf dem Markt verfügbar war, die solche Messungen erlaubt hätte.

Zur Zeit werden zwei Produkte angeboten, mit denen prinzipiell der Gehalt an Prokollagenase 3 bestimmt werden kann. Beide Tests unterscheiden jedoch nicht
 15 zwischen dem Proenzym und der aktivierten Kollagenase 3.

1. Biotrak[®] Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system

Der erste Test, das *Biotrak Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system*, ist für die Körperflüssigkeiten Serum und Plasma validiert. Das Problem des Testes ist die sehr
 20 geringe Sensitivität. Außerdem ist der Test nicht für Untersuchungen von Gelenkflüssigkeit validiert und kann somit für diesen Zweck nicht verwendet werden.

2. Quantikine[®] pro-MMP-13 Immunoassay

Das zweite Testsystem auf dem Markt ist ausschließlich für den Gebrauch in der Zellkultur bestimmt und kann somit nicht für Untersuchungen von Prokollagenase 3 in
 25 Körperflüssigkeiten eingesetzt werden.

Der Erfindung lag demzufolge die Aufgabe zugrunde, einen ELISA-Kit zur Verfügung zu stellen, der sich im Gegensatz zu den auf dem Markt befindlichen Tests durch eine
 30 hohe Sensitivität auszeichnet und sowohl für den Nachweis der Prokollagenase 3 und der aktivierten Form dieses Enzyms in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen, als auch in Zellkulturüberständen geeignet ist. Die Erfindung sollte darüber hinaus auch erstmals die Möglichkeit bieten, in

Zellkulturüberständen und Körperflüssigkeiten hochspezifisch das quantitative Verhältnis zwischen latenter und aktivierter Form dieses Enzyms zu bestimmen.

- 5 Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert.

Die erfindungsgemäßen ELISA-Kits zum Nachweis von Prokollagenase 3 und aktivierter Kollagenase 3 umfassen in separater Verpackung wenigstens:

- 10 a) einen festen Träger mit daran gebundenen monoklonalen Antikörpern, die sensitiv und spezifisch humane Prokollagenase 3 oder aktivierte Kollagenase 3 binden;
- b) humane rekombinante Prokollagenase 3 oder aktivierte Kollagenase 3 als Standard zur quantitativen Bestimmung dieses Enzyms in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen;
- 15 c) einen Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Kollagenase 3;
- d) einen Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Proben;
- e) ein detektierbar markiertes Konjugat, das an Kollagenase 3 bindet; und
- 20 f) ein Substrat, das die Sichtbarmachung des detektierbar markierten Konjugats erlaubt,

wobei es sich bei den unter a) genannten monoklonalen Antikörpern entweder vorzugsweise um Anti-MMP-13 Klon M34 (Maus) handelt, und besonders bevorzugt um monoklonale Antikörper, die von dem Hybridom mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 gebildet werden, oder vorzugsweise um Anti-MMP-13 Klon EE1
25 (Maus) handelt.

Als detektierbar markiertes Konjugat wird entweder eine Kombination von zwei Komponenten eingesetzt, wobei es sich bei der ersten Komponente um biotinylierte Antikörper handelt, die an Kollagenase 3 binden; und als zweite Komponente um ein
30 hochpolymeres Streptavidin-Konjugat, das an die biotinylierten Antikörper bindet.

Alternativ dazu können auch konjugierte Antikörper eingesetzt werden, die an Kollagenase 3 binden.

Die Antikörper, die als Konjugat fungieren, können monoklonale und/oder polyklonale Antikörper sein.

Humane rekombinante Prokollagenase 3, die in eukaryontischen Zellen (Sf9-Zellen) exprimiert wurde, wird als Standard zur quantitativen Bestimmung der Prokollagenase 3 in Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberständen eingesetzt. Sie liegt entweder in Lösung oder in gefriergetrockneter Form vor, in der sie mehrere Monate ohne Qualitätsverlust haltbar ist. Bei Vorliegen in gefriergetrockneter Form muß die rekombinante Prokollagenase 3 vor Benutzung zunächst durch Zugabe von destilliertem Wasser rekonstituiert werden. Humane rekombinante aktivierte Kollagenase 3 wird aus oben genannter Prokollagenase 3 unter Zugabe von Acetamino-phenyl-mercury-acetate (APMA). hergestellt und in gleicher Weise verwendet.

Der für die Verdünnung von zu untersuchenden Proben vorgesehene Puffer enthält neben blockierenden und stabilisierenden Substanzen unter anderem Natriumcitrat. Es zeigte sich überraschenderweise, dass dieses Reagenz für die Vorbereitung von Serum des Menschen zur Messung von Kollagenase 3 besonders gut geeignet ist.

Der Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Prokollagenase 3 oder der aktivierten Kollagenase 3 zur Messung dieser Marker in Serum enthält humanes Serum.

Als feste Träger werden vorzugsweise Mikrotiterplatten verwendet, an welche die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper gebunden sind. Diese Mikrotiterplatten werden so produziert, dass sie mehrere Monate ohne Qualitätsverlust gelagert werden können.

Gegenstand der Erfindung sind auch monoklonale Antikörper, die Kollagenase 3 als Proenzym oder aktiviertes Enzym spezifisch erkennen und binden, wobei diese monoklonalen Antikörper von Hybridomzelllinien mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 produziert werden bzw. Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 aufweisen.

Zur Erfindung gehören ebenso Antikörper, die Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinien mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 aufweisen, die jedoch biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein können, wobei dem Antikörper ggf. Teile, die für die Erkennung der Prokollagenase 3 nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind.

Durch die erfindungsgemäßen ELISA-Kits werden der Nachweis von Prokollagenase 3 und von aktivierter Kollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen, sowie in Zellkulturüberständen mit hoher Sensitivität ermöglicht und damit dieser potentielle Krankheitsmarker der medizinischen Diagnostik besser zugänglich gemacht.

Im Vergleich zu dem *Biotrak[®] Matrix Metalloproteinase-13 ELISA system* ist die Sensitivität der erfindungsgemäßen ELISA-Kits um den Faktor zehn höher. In Zahlen ausgedrückt liegt die untere Nachweisgrenze der ELISAs bei 4 pg Prokollagenase 3 bzw. bei 6 pg aktivierter Kollagenase 3 / ml Probe.

Die bei der Messung ermittelte Standardkurve durch Untersuchung einer mitgeführten humanen rekombinanten Prokollagenase 3 bzw. der aktivierten Kollagenase 3 erlaubt eine schnelle Berechnung des Kollagenasegehaltes in Proben mit Hilfe der dem Standardverlauf zugrunde liegenden Regressionsfunktion. Ein weiterer entscheidender Vorteil ist, dass die ELISA-Kits im Kühlschrank gelagert werden können, was die Handhabbarkeit und Verbraucherfreundlichkeit wesentlich verbessert.

Die erfindungsgemäßen ELISA-Kits zum Nachweis von Prokollagenase 3 bzw. aktivierter Kollagenase 3 weisen insgesamt für den Endverbraucher eine mindestens einmonatige Haltbarkeit auf. Die Produktion erfolgt nach Standards der EN 46001 und EN ISO 9001. Die ELISA-Kits bieten erstmals die Möglichkeit zur Untersuchung von Gelenkflüssigkeit.

In einer Studie mit Patientenseren wird mit den erfindungsgemäßen ELISA Kits erstmalig gezeigt, dass Kollagenase 3 ein Marker zur Verlaufskontrolle von Rheumatoider Arthritis, aber auch von schweren Fällen mit Organbeteiligung und Gewebeproliferation von systemischem Lupus Erythematosus ist. Eine mit den

erfindungsgemäßen ELISA Kits nachgewiesene Erhöhung des Gehaltes an MMP-13 im Serum geht bei schweren Verlaufsformen von Rheumatoider Arthritis einer akuten klinischen Verschlechterung des Krankheitsbildes voraus. Das Enzym ist nicht zu jeder Zeit im Serum nachweisbar, daher ist dieser Marker vorrangig für die

5 Verlaufsprognostik ausgewählter Erkrankungen geeignet, insbesondere für einen präventiven Therapiebeginn, bevor sich beim Patienten Beschwerden klinisch bemerkbar machen

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von Kollagenase 3

- 10 - als serologischer Marker für die Diagnostik und insbesondere die Verlaufskontrolle von entzündlichen rheumatischen Erkrankungen, insbesondere von Rheumatoider Arthritis und
- als serologischer Marker für die Diagnostik und insbesondere die Verlaufskontrolle von systemischem Lupus Erythematosus, insbesondere zur Verlaufsprognose bei
- 15 gleichzeitiger Gewebeproliferation (Tumorbildung).

Kollagenase 3 kann weiterhin auch als serologischer Marker für die Diagnostik und Verlaufskontrolle anderer Tumor-Erkrankungen, insbesondere von Mamma-Carcinomen und Colorectalcarcinomen verwendet werden.

- 20 Auch für die Diagnostik und Verlaufskontrolle weiterer Erkrankungen, bei denen eine Erhöhung von Kollagenase 3 beschrieben ist, kann Kollagenase 3 als serologischer Marker eingesetzt werden.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele und Abbildungen näher erläutert werden.

Beispiel 1: Herstellung und Screening der monoklonalen Antikörper

5

Zur Immunisierung wurden Mäuse verwendet. Als Antigen diente humane rekombinante Prokollagenase 3, die in Sf9-Zellen exprimiert wurde. Das Antigen wurde folgendermaßen vorbereitet: 50 µg MMP-13 in 100 µl PBS + 100 µl 6M Harnstoff wurden vorgelegt. Zu dieser Lösung wurden 100 µl CFA oder IFA gegeben.

10 Die Injektion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Tag 0: 50 µg MMP-13 intraperitoneal in CFA

Tag 13: 50 µg intraperitoneal in IFA

Tag 41: 50 µg intravenös in 1 ml PBS

Tag 44: Hybridisierung von Pre-Lymphozyten mit Milz- und SP 2/0 Myelomzellen.

15

Es wurden drei Hybridisierungen aus ein und derselben Milz mit verschiedenen Lymphozytenmengen durchgeführt. Die dritte Hybridisierung war erfolgreich.

Überstände der ausgewachsenen Hybridome wurden im ELISA getestet. Dazu wurden 100 µl rekombinante humane Prokollagenase 3 (1 µg/ml in PBS) in den Näpfen einer

20 Titerplatte über Nacht bei 4 °C immobilisiert und nach 3 Wasch-Schritten (PBS mit 0,05 % Tween® 20) mit einem Blockierungspuffer (1 % BSA in PBS) zwei Stunden blockiert. Jeweils 50 µl der Zellkulturüberstände sowie Positiv- und Negativkontrollen wurden für eine Stunde (37 °C) in die Näpfe gegeben. Nach dieser Inkubation wurde die Platte dreimal gewaschen und für eine weitere Stunde (37 °C) 100 µl Anti-Maus

25 IgG(H+L)-POD-Konjugat zugegeben. Nach weiteren fünf Waschungen wurde der POD-Gehalt in den Näpfen mit je 100 µl TMB Substrat (20 min, RT) detektiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 450 nm gemessen.

Die im ELISA positiven Hybridomüberstände wurden bis zur Monoklonalität kloniert

30 und rekloniert. Es wurden 5 unabhängige monoklonale Antikörper erhalten, aus denen insgesamt 12 Subklone mit teilweise veränderten Affinitäten gewonnen wurden. Eine Hybridomzelllinie, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper Anti-MMP-13 Klon M34 (Maus) produziert (IgG1), wurde bei der Deutschen Sammlung von

Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM ACC 2572Z) in Braunschweig unter der Nummer DSM ACC 2572 am 27. 08. 02 hinterlegt.

Beispiel 2: Durchführung der ELISAs

5

Das Prinzip der ELISAs ist in Abbildung 1 dargestellt. Zur Durchführung der ELISAs wird aus der humanen rekombinanten Kollagenase 3 eine Verdünnungsreihe als Standard erstellt, welche die rekombinante Prokollagenase 3 (bzw. aktivierte Kollagenase 3) in folgenden Konzentrationen enthält: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250
10 pg/ml, 125 pg/ml, 63 pg/ml, 32 pg/ml, 16 pg/ml, 0 pg/ml (Start der Verdünnungsreihe zur Bestimmung aktivierter Kollagenase 3: 2000 pg/ml). Wenn der Kollagenase 3 Gehalt in Serum bestimmt werden soll, wird die Standardverdünnung mit einem speziellen Puffersystem hergestellt, das 10 % humanes Serum enthält. Jeweils 100 µl dieser Standardverdünnungen werden in Doppelbestimmung in die Vertiefungen der
15 Mikrotiterplatte, an die monoklonale Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 gebunden sind, pipettiert. Die zu messenden Proben (Zellkulturmedium, Gelenkflüssigkeit oder Serum) werden mit dem für die Probenvorbereitung vorgesehenen Puffer verdünnt. Von den verdünnten Proben werden dann ebenfalls jeweils 100 µl in Doppelbestimmung aufgetragen.

20 Nach 120 Minuten Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wird die Mikrotiterplatte mit dem Waschpuffer vier Mal gewaschen und danach durch Ausschlagen auf Papierhandtüchern die verbliebene Flüssigkeit entfernt. Es folgt der Eintrag von jeweils 100 µl Detektionslösung 1, die biotinylierte Antikörper enthält, in alle benutzten Wells der Mikrotiterplatte. Hierbei handelt es sich entweder um
25 polyklonale Antikörper oder aber um einen monoklonalen Antikörper oder einen Cocktail aus mehreren monoklonalen Antikörpern. Nach weiteren 90 Minuten Inkubation wird die Mikrotiterplatte wiederum vier Mal gewaschen und auf einem Papiertuch ausgeschlagen. Die Detektionslösung 2, bestehend aus einem Streptavidin-Peroxidasekonjugat und einem Verdünnungspuffer, wird gemäß Anweisung hergestellt
30 und wiederum jeweils 100 µl in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Es folgt eine weitere Inkubation von 30 Minuten. Danach wird die Mikrotiterplatte fünf Mal gewaschen und ausgeschlagen, mit 100 µl pro Vertiefung Substratlösung (Tetramethylbenzidin) versehen und im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden 100 µl Stopplösung (0,5 M Schwefelsäure) den

Vertiefungen zugesetzt und die Mikrotiterplatte bei 450 nm in einem Mikrotiterplattenreader gemessen. Die Intensität der optischen Dichte entspricht dem Gehalt an Kollagenase 3.

5 Beispiel 3: Untersuchung von Körperflüssigkeiten mit dem ELISA-Kit

Es wurde eine größere Anzahl von Patientenseren mit unterschiedlichen Erkrankungsbildern mithilfe der ELISA-Kits gemessen.

Tabelle 1: Messung von Pro-MMP-13 und aktivierter MMP-13 mit den beiden

- 10 InviLISA MMP-13 Kits. Die Tabelle gibt die Größe des Probenkollektivs sowie die Anzahl der positiven Proben (in den jeweiligen Tests und insgesamt) an. RA = Rheumatoide Arthritis; pSS = primäres Sjögren Syndrom; sLE = systemischer Lupus Erythematosus.

Erkrankung	Kollektiv (n)	Pro MMP-13	Act MMP-13	gesamt pos
RA	145	7	22	20 %
pSS	50	0	0	0 %
sLE	40	0	1	3 %
Myositis	33	0	1	3 %
Sklerodermie	15	0	0	0 %
Vaskulitis	21	0	0	0 %
Fibromyalgie	15	0	0	0 %
Blutspender	160	3	1	2 %

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen: Während in einem Kontrollkollektiv von Blutspendern nur etwa 2 % positiv in den Tests reagierten, zeigten 20 % der Seren von Patienten mit Rheumatoider Arthritis positive Signale.

Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen (systemischer Lupus Erythematosus, Myositis, Sklerodermie, Vaskulitis, Fibromyalgie) waren mit dem Kontrollkollektiv vergleichbar. Es wurden außerdem Serumproben von Patienten mit Rheumatoider Arthritis gemessen, die im Verlauf von zwei bis drei Jahren erhoben worden waren. Es sind exemplarisch zwei Verläufe dargestellt (Abb. 2 und 3). Abb. 2 zeigt deutlich erhöhte aktive MMP-13 Werte unmittelbar vor Einsetzen einer klinischen Verschlechterung, die mit einem massiven Anschwellen des rechten Kniegelenkes einhergeht. Der langsam einsetzenden klinischen Besserung folgt ein Absinken des MMP-13 Titters.

Abb. 3 zeigt ebenso wie Abb. 2 die besondere Eignung der aktivierten Kollagenase 3 als Verlaufsmarker für Rheumatoide Arthritis. In den ersten sechs Monaten des Untersuchungszeitraumes sind die gemessenen MMP-13 Werte nicht erhöht bzw. liegen unterhalb des definierten Cut-Off von 300 pg/ml MMP-13. Der betreffende Patient wurde im November 1998 geröntgt, wobei die Handgelenke als Grad 1 nach Larsen klassifiziert wurden. Im Dezember 1998 erlitt der Patient einen massiven Schub, der mit gemessenen stark erhöhten MMP-13 Werten einherging. Im Juni 1999 belegten Kontroll-Röntgenaufnahmen eine progrediente Destruktion der Handgelenke (Larsen Grad 2) sowie eine beginnende Destruktion der Fußgelenke (Larsen Grad 1).

Als Kontrolle wurden Verlaufsmessungen in Seren von Patienten mit Sjögren Syndrom durchgeführt. Diese zeigten zu keinem Zeitpunkt erhöhte MMP-13 Werte. (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 4 sind zwei exemplarische Verlaufsmessungen von Patienten mit systemischem Lupus Erythematosus (sLE) dargestellt. Während selbst Seren von Patienten mit schweren Krankheitsverläufen keine oder nur marginal erhöhte MMP-13 Werte aufwiesen (Abb. 4 A, sLE mit renaler Beteiligung, sehr schwere Symptomatik), zeigten Seren von sLE-Patienten mit Gewebeproliferation erhöhte Werte an aktivierter MMP-13 (Abb. 4 B, sLE mit renaler Beteiligung, membran-proliferierende Glomerulo-Nephritis Typ IV a, schwere Symptomatik). Diese Messungen weisen darauf hin, dass MMP-13 ein Indikator für Tumorwachstum sein kann.

Legende zu den Abbildungen

Abbildung 1: Prinzip des Nachweisverfahrens

- 5 **Schritt 1:** Inkubation von Standards oder Proben auf der Titerplatte. Spezifische Bindung von Kollagenase 3 (MMP-13) als Proenzym oder in aktivierter Form (Dauer: 120 Minuten)
- Schritt 2:** Detektion der gebundenen Kollagenase 3 (MMP-13) mit biotinyliertem Antikörper (Dauer: 90 Minuten)
- 10 **Schritt 3:** Zugabe von Streptavidin-Peroxidase-Konjugat (Dauer: 30 Minuten)
- Schritt 4:** Farbentwicklung nach Zugabe von TMB-Substrat (Dauer: 15 Minuten)

Abbildung 2: Messung von aktiverter MMP-13 im Serum eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis (Larsen III, DAS-Score > 3,8).

- 15 In den Proben waren keine erhöhten Pro-MMP-13 Werte nachweisbar. Deutlich ist die Erhöhung der MMP-13 Werte im Serum unmittelbar zum Zeitpunkt eines Schubes sowie das anschließende Absinken der Werte während der Remission (Pfeile).

Abbildung 3: Messung von Pro-MMP-13 (schwarze Balken) und aktivierter MMP-13

- 20 (graue Balken) im Serum eines Patienten mit Rheumatoider Arthritis.
Erläuterungen im Text. RA = Rheumatoide Arthritis; St. = Stadium; HG = Handgelenk, FG = Fußgelenk.

Abbildung 4: Messung von Pro-MMP-13 (schwarze Balken) bzw. aktivierter MMP-13

- 25 (graue Balken) in Seren von zwei Patienten mit sLE.
A: sLE-Patient mit renaler Beteiligung, nephrotisches Syndrom, sehr schwere Symptomatik. B: sLE-Patient mit renaler Beteiligung, schwere Symptomatik, proliferierende Glomerulo-Nephritis Typ IV a. Erläuterungen im Text.

Patentansprüche

1. ELISA-Kit zum Nachweis von Prokollagenase 3 bzw. aktivierte Kollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen, sowie in Zellkulturüberständen, umfassend in separater Verpackung wenigstens:

 - a) einen festen Träger mit daran gebundenen monoklonalen Antikörpern, die sensitiv und spezifisch humane Prokollagenase 3 bzw. aktivierte Kollagenase 3 binden;
 - b) humane rekombinante Prokollagenase 3 bzw. aktivierte Kollagenase 3 als Standard zur quantitativen Bestimmung dieses Enzyms in Körperflüssigkeiten;
 - c) einen Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Prokollagenase 3 bzw. aktivierten Kollagenase 3;
 - d) einen Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Probe;
 - e) ein detektierbar markiertes Konjugat, das an Kollagenase 3 bindet;
 - f) und ein Substrat, das die Sichtbarmachung des detektierbar markierten Konjugats erlaubt.

2. ELISA-Kit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den monoklonalen Antikörpern, die an den festen Träger gebunden sind, vorzugsweise um monoklonale Antikörper handelt, die von dem Hybridom mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 gebildet werden.

3. ELISA-Kit nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als detektierbar markiertes Konjugat eine Kombination von zwei Komponenten eingesetzt wird, wobei es sich bei der ersten Komponente um einen biotinylierten Antikörper handelt, der an Prokollagenase 3 bzw. an aktivierte Kollagenase 3 bindet; und als zweite Komponente ein hochpolymeres Streptavidin-Konjugat eingesetzt wird, das an die biotinylierten Antikörper bindet.

4. ELISA-Kit nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als detektierbar markiertes Konjugat ein konjugierter Antikörper eingesetzt wird, der an Kollagenase 3 bindet.

5. ELISA-Kit nach Anspruch 1, 2 und 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörper, die als Konjugat fungieren, monoklonale und/oder polyklonale Antikörper sind.
- 5 6. ELISA-Kit nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass die als Konjugate eingesetzten Substanzen mit allen üblichen Substanzen konjugiert werden können, vorzugsweise mit:
- Meerrettichperoxidase
 - alkalischer Phosphatase.
- 10 7. ELISA-Kit nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass die als Standard eingesetzte humane rekombinante Kollagenase 3 in eukaryontischen Zellen exprimiert wurde und in Lösung oder lyophilisiert vorliegt.
- 15 8. ELISA-Kit nach Anspruch 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass der Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Körperflüssigkeiten und Zellkulturüberstände Natriumcitrat enthält.
- 20 9. ELISA-Kit nach Anspruch 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass als feste Träger Mikrotiterplatten oder gängige Proteinchip-Technologien eingesetzt werden.
- 25 10. Monoklonale Antikörper, die Prokollagenase 3 spezifisch erkennen und binden, wobei diese monoklonalen Antikörper Eigenschaften wie die monoklonalen Antikörper aus der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 aufweisen.
- 30 11. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 10, wobei die monoklonalen Antikörper biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein können, wobei den Antikörpern ggf. Teile, die für die Erkennung der Prokollagenase 3 nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind.
12. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 10-11, die von der Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 produziert werden.

13. Hybridomzelllinie mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572

14. Monoklonale Antikörper, die aktivierte Kollagenase 3 spezifisch und sensitiv erkennen und binden, wobei diese Antikörper keine Affinität zu Prokollagenase aufweisen

5

15. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 10, wobei die monoklonalen Antikörper biochemisch oder molekularbiologisch verändert oder synthetisch sein können, wobei den Antikörpern ggf. Teile, die für die Erkennung der aktivierten Kollagenase 3 nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind.

10

16. Verwendung von Kollagenase 3 als serologischen Marker für die Diagnostik und insbesondere die Verlaufskontrolle von entzündlichen rheumatischen Erkrankungen, insbesondere von Rheumatoider Arthritis.

15 17. Verwendung von Kollagenase 3 als serologischer Marker für die Diagnostik und insbesondere die Verlaufskontrolle von systemischem Lupus Erythematosus, insbesondere zur Verlaufsprognose bei gleichzeitiger Gewebeproliferation (Tumorbildung).

20 18. Verwendung von Kollagenase 3 als serologischer Marker für die Diagnostik und Verlaufskontrolle anderer Tumor-Erkrankungen, insbesondere von Mamma-Carcinomen und Colorectalcarcinomen.

25 19. Verwendung von Kollagenase 3 als serologischer Marker für die Diagnostik und Verlaufskontrolle weiterer Erkrankungen, bei denen in der wissenschaftlichen Literatur eine Erhöhung von Kollagenase 3 beschrieben ist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ELISA-Kits zum Nachweis von Prokollagenase 3 und aktivierter Kollagenase 3 in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum und Gelenkflüssigkeit des Menschen sowie in Zellkulturüberständen, und monoklonale Antikörper, die diese Antigene spezifisch erkennen.

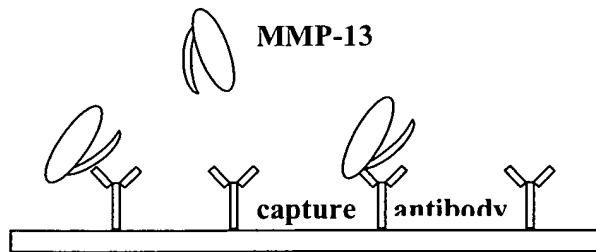
Der ELISA-Kit umfaßt in separater Verpackung wenigstens:

- a) einen festen Träger mit daran gebundenen monoklonalen Antikörpern, die sensitiv und spezifisch humane Prokollagenase 3 oder aktivierte Kollagenase 3 binden;
- b) humane rekombinante Prokollagenase 3 oder aktivierte Kollagenase 3 als Standard zur quantitativen Bestimmung dieses Enzyms;
- c) ein Puffer zum Herstellen einer Standardreihe der rekombinanten Kollagenase 3;
- d) ein Puffer zum Verdünnen der zu untersuchenden Körperflüssigkeiten;
- e) ein detektierbar markiertes Konjugat, das an Kollagenase 3 bindet; und
- f) ein Substrat, das die Sichtbarmachung des detektierbar markierten Konjugats erlaubt,

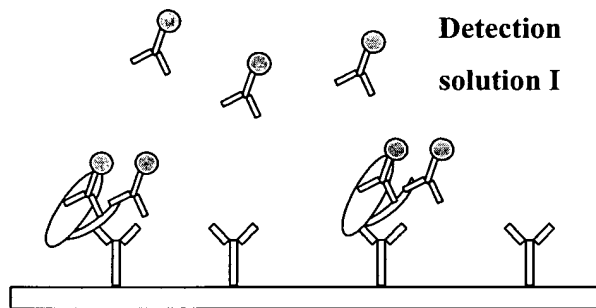
wobei es sich bei den unter a) genannten monoklonalen Antikörpern vorzugsweise um monoklonale Antikörper handelt, die von dem Hybridom mit der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2572 gebildet werden.

Anwendungsgebiete sind die Medizin und hier besonders die medizinische Diagnostik, insbesondere die Verlaufskontrolle von Rheumatoider Arthritis, systemischem Lupus Erythematosus sowie von Tumorerkrankungen.

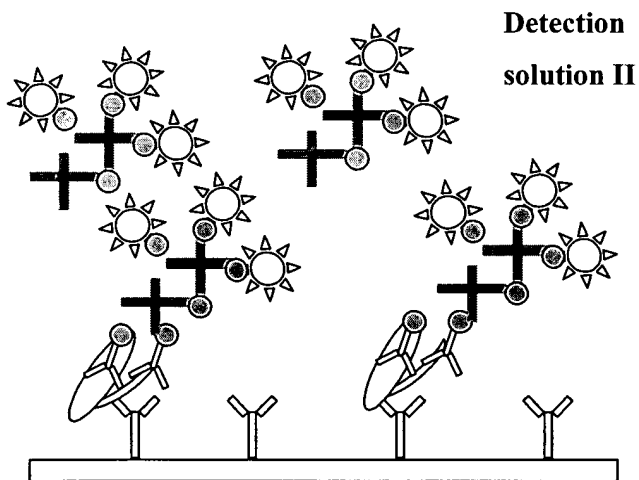
Abbildung 1



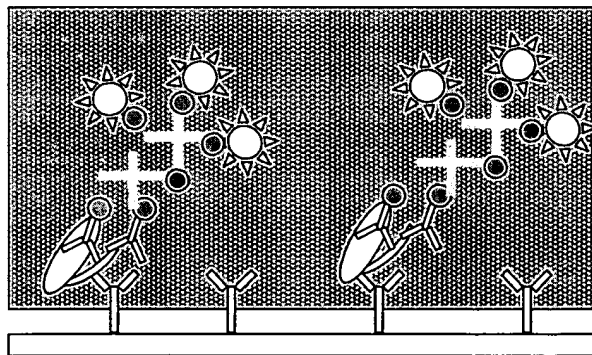
Schritt 1



Schritt 2



Schritt 3



Schritt 4

Abbildung 2

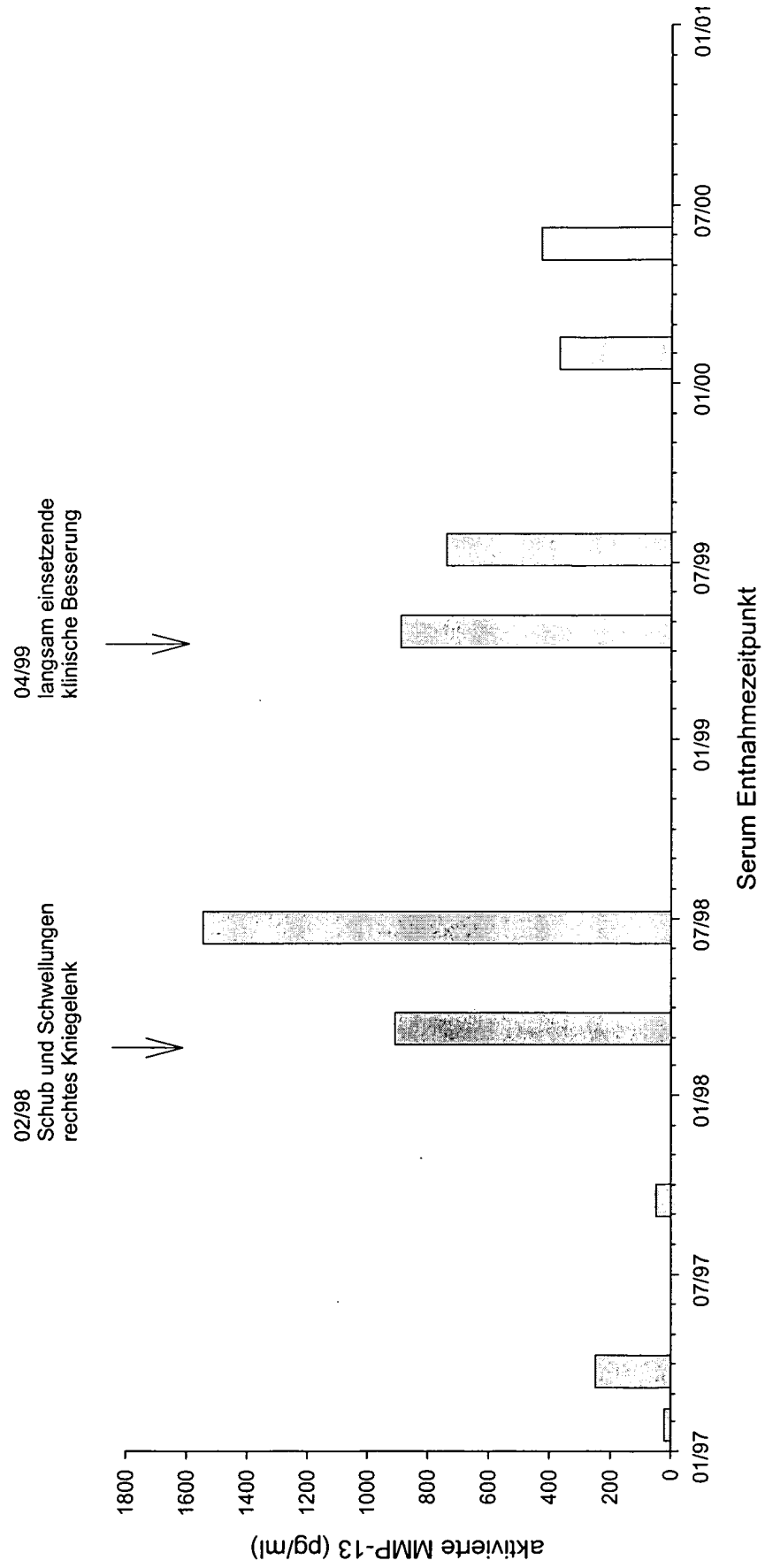


Abbildung 3

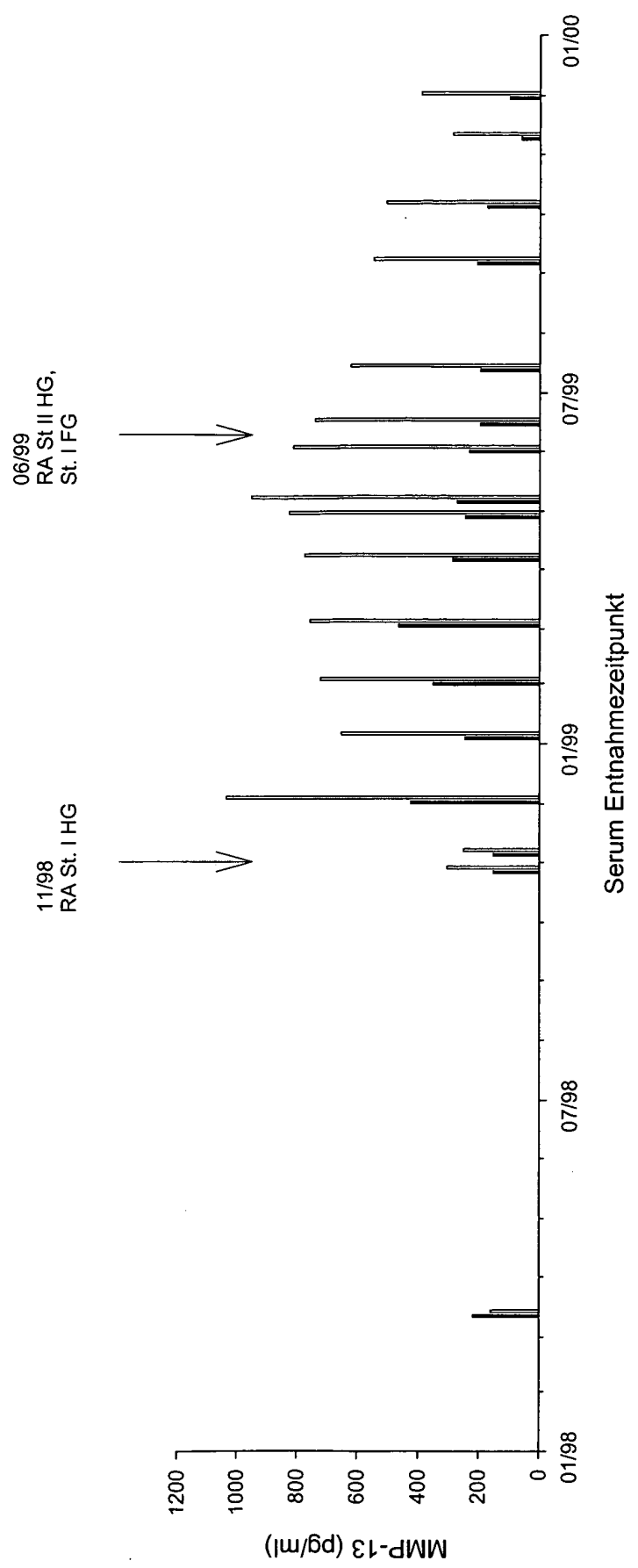


Abbildung 4

